



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Frações enriquecidas com proantocianidinas da casca do fruto da *Annona crassiflora* com propriedades antioxidante e antiglicante e potencial inibitório contra hidrolases glicosídicas

João Pedro Csik Batista

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG

Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Frações enriquecidas com proantocianidinas da casca do fruto da *Annona crassiflora*
com propriedades antioxidante e antiglicante e potencial inibitório contra hidrolases
glicosídicas**

João Pedro Csik Batista

Orientador: Foued Salmen Espindola

Coorientador: Allisson Benatti Justino

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia - MG

Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Frações enriquecidas com proantocianidinas da casca do fruto da *Annona crassiflora*
com propriedades antioxidante e antiglicante e potencial inibitório contra hidrolases
glicosídicas**

João Pedro Csik Batista

Orientador: Foued Salmen Espindola

Coorientador: Allisson Benatti Justino

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em __/__/__

Coordenadora do curso
Profa. Dra. Celine de Melo

Uberlândia-MG
Julho 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Frações enriquecidas com proantocianidinas da casca do fruto da *Annona crassiflora*
com propriedades antioxidante e antiglicante e potencial inibitório contra hidrolases
glicosídicas**

João Pedro Csik Batista

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: ____

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, UFU/MG

Uberlândia, de de

AGRADECIMENTOS:

Agradeço primeiramente aos meus pais por todo apoio, esforço e carinho investidos em mim, ao meu estimado orientador Prof. Dr. Foued Salmen Espindola e ao meu coorientador Mestre Allisson Benatti Justino. Agradeço também todos os integrantes do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular e a todos os meus amigos que sempre estiveram do meu lado.

RESUMO:

A espécie *Annona crassiflora* cujo o fruto é conhecido popularmente como Araticum, é um membro da família Annonaceae que é encontrada no Cerrado Brasileiro. Na casca do araticum é possível encontrar diversos compostos fenólicos, em especial as proantocianidinas que são moléculas conhecidas por trazerem benefícios a saúde humana. No presente estudo foi fracionado o extrato de acetato de etila da casca do araticum para se chegar em uma fração enriquecida com proantocianidinas. A fração obtida foi então submetida a diversos ensaios para se detectar as capacidades antioxidante, antiglicante e a capacidade de inibir hidrolases glicosídicas. Os resultados obtidos mostraram que a fração apresentou uma alta capacidade antioxidante, também foi capaz de inibir as enzimas α -amilase e α -glicosidase e apresentou capacidade de inibir o processo de glicação. A análise HPLC-ESI-MS / MS identificou as proantocianidinas, mostrando que seu isolamento no extrato de acetato de etila da casca do araticum foi um sucesso. Os resultados desse estudo comprovam que na casca do araticum se encontram compostos que trazem grandes benefícios a saúde humana e que podem ser utilizados na forma de alimentos, suplementos ou na forma de produtos farmacêuticos, sendo uma alternativa natural ao tratamento de diversas doenças e patologias.

ABSTRACT:

The species *Annona crassiflora* whose fruit is popularly known as Araticum, is a member of the Annonaceae family that is found in the Brazilian Cerrado. In the araticum peel is possible to find several phenolic compounds, in particular the proanthocyanidins that are molecules known to bring benefits to human health. In the present study the ethyl acetate extract from the araticum peel was fractionated to reach a fraction enriched with proanthocyanidins. The fraction obtained was then subjected to several tests to detect antioxidant, anti glycation and the ability to inhibit glycosidic hydrolases. The results showed that the fraction presented a high antioxidant capacity, it was also able to inhibit the α -amylase and α -glycosidase enzymes and presented an ability to inhibit the glycation process. The HPLC-ESI-MS / MS analysis identified the proanthocyanidins, showing that their isolation in the ethyl acetate extract of the araticum peel was a success. The results of this study confirm that in the araticum peel are compounds that bring great benefits to human health and can be used in the form of food, supplements or in the form of pharmaceuticals, being a natural alternative to the treatment of various diseases and pathologies.

Palavras-chave: Araticum, compostos fenólicos, proantocianidinas, antioxidante, antiglicante, hidrolases glicosídicas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:	8
1.1 PLANTAS MEDICINAIS:	8
1.2 ARATICUM:	8
1.3 COMPOSTOS SECUNDÁRIOS:	9
1.4 PROANTOCIANIDINAS:	9
1.5 CAPACIDADES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS:	11
1.6 CAPACIDADES ANTIOXIDANTES:	11
1.7 GLICAÇÃO NÃO ENZIMÁTICA E CAPACIDADE DE INIBIR A GLICAÇÃO:	12
2. OBJETIVO GERAL:	13
3. MATERIAL E MÉTODOS:	13
3.1 MATERIAL VEGETAL:	13
3.2 PREPARO DE EXTRATO ETANÓLICO:	13
3.3 PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO:	13
3.4 FRACIONAMENTO DE PROANTOCIANIDINAS:	14
3.5 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA:	14
3.6 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS NO EXTRATO DE ACETATO DE ETILA:	14
3.7 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROANTOCIANIDINAS NO EXTRATO DE ACETATO DE ETILA:	15
3.8 DPPH:	15
3.9 ORAC:	16
3.10 INIBIÇÃO DA α-AMILASE:	17
3.11 INIBIÇÃO DA α-GLICOSIDASE:	18
3.12 INIBIÇÃO DA GLICAÇÃO:	18
4. RESULTADOS:	19
4.1 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA:	19
4.2 CONTEÚDO TOTAL DE FENÓIS E PROANTOCIANIDINAS:	19
4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE:	19
4.4 INIBIÇÃO DAS HIDROLASES GLICOSIDICAS:	20
4.5 INIBIÇÃO DA GLICAÇÃO:	20
5. DISCUSSÃO:	25
6. CONCLUSÃO:	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	28

1. INTRODUÇÃO:

1.1 PLANTAS MEDICINAIS:

Plantas medicinais são utilizadas desde o início da história da humanidade para o tratamento de doenças e patologias. As propriedades terapêuticas dessas plantas derivam da capacidade de sintetizar compostos químicos que tem algum efeito no corpo humano. Estudos mostram que a maioria dos temperos e ervas utilizados na comida pelos seres humanos contem compostos medicinais uteis (49,84). A substância presente nas plantas medicinais responsáveis pelos efeitos terapêuticos é chamada de princípio ativo. O isolamento dos princípios ativos e o estudo dos mecanismos pelos quais eles atuam são as principais propriedades da farmacologia.

1.2 ARATICUM:

O araticum (*Annona crassiflora*), é uma fruta típica do cerrado brasileiro pertencente à família Annonaceae, também é conhecida pelos nomes de marolo ou pinha-do-cerrado, sua polpa doce de sabor característico é bastante apreciada pela população local, podendo ser consumida *in natura* ou na forma de doces, geleias, sucos iogurte ou sorvete (6). Essa planta apresenta uma boa produção de polpa assim como em outras frutas da família Annonaceae e suas sementes se separam facilmente (87). Trata-se de um fruto grande que é apreciado por seu aroma característico marcante.

Esse fruto do cerrado apresenta um grande valor comercial, socioeconômico e medicinal, sendo utilizado também como uma fonte de renda alternativa para agricultores familiares, apresenta utilidade para o tratamento de algumas doenças, além de apresentar em suas folhas arginina ($C_6H_{14}N_4O_2$), histidina ($C_6H_9N_3O_2$) e lisina ($C_6H_{14}N_2O_2$), que são aminoácidos importantes para a manutenção do mecanismo fisiológico humano (14). Suas sementes apresentam substâncias biologicamente ativas como potencial na germinação e o potencial alelopático de esteroides usados no combate a plantas daninhas (74). A polpa do araticum é rica em carotenoides, polifenóis, tocoferóis, flavonoides e algumas vitaminas minerais (72). Várias espécies do gênero *Annona* apresentam policetídeos com atividades citotóxica, antitumoral, pesticida, antimicrobiana e antiparasitária (55). A casca do araticum é descartada em grande quantidade na produção de sucos e alimentos, sendo um subproduto do fruto que é muito pouco utilizado devido ao sabor adstringente que deriva do alto teor de compostos fenólicos (72).

A. crassiflora vem sendo ameaçada de extinção constantemente, devido ao avanço das pastagens e lavouras e ao desmatamento (10,51). Pouco se conhece sobre as técnicas de cultivo e de produção de mudas dessa espécie, devido ao fato de ainda serem plantadas em estado selvagem, ou devido sua grande variabilidade genética. Ainda se faltam informações sobre sua biologia, utilização agrônômica e florestal (5). A caracterização fitoquímica da *A. crassiflora* é de grande importância uma vez que existem poucos estudos científicos que falam a respeito das características bioquímicas dos frutos do Cerrado e seus subprodutos (79). O maior entendimento das propriedades biológicas dos frutos do cerrado pode favorecer com a segurança no consumo dos seus produtos naturais assim como contribuir para a sustentabilidade do bioma Cerrado. Além disso, esse maior entendimento pode contribuir para o desenvolvimento de novos produtos e o isolamento de substâncias para o melhor tratamento de algumas doenças (42).

1.3 COMPOSTOS SECUNDÁRIOS:

Os compostos secundários das plantas são produtos de seu metabolismo. Normalmente os compostos secundários de plantas são classificados de acordo com sua rota biossintética (36). São três as principais famílias de moléculas que são consideradas: os compostos alcaloides, os terpênicos e os fenólicos, sendo os compostos fenólicos o grupo de interesse para o presente trabalho, uma vez que as proantocianidinas fazem parte deste grupo.

São chamados de compostos secundários, uma vez que não estão diretamente envolvidos nos processos mais fundamentais da planta como o crescimento, o desenvolvimento e a reprodução (27). Esses metabolitos secundários têm importante função na adaptação das plantas ao ambiente em que estão. Esses produtos contribuem para que os organismos tenham uma boa interação com os diferentes ecossistemas (3,37). Os compostos secundários aumentam a chance de sobrevivência de uma espécie, já que são os responsáveis pelas atividades biológicas relacionadas a sobrevivência (53).

1.4 PROANTOCIANIDINAS:

As proantocianidinas, ou taninos condensados, são compostos fenólicos muito abundantes na natureza, sendo encontrados em diversos alimentos de origem vegetal (75). São responsáveis pela adstringência de vários alimentos, devido à sua capacidade de formar complexos com as proteínas existentes na saliva (75).

As proantocianidinas são oligômeros ou polímeros de flavan-3-óis, podendo existir ligações $C_4 \rightarrow C_8$ ou $C_4 \rightarrow C_6$ entre os monómeros. São as chamadas estruturas de tipo B. Poderá

existir uma ligação éter adicional entre $C_2 \rightarrow O_7$, originando as proantocianidinas tipo A. As unidades monoméricas que as compõem são designadas catequinas e (epi)catequinas (98) (Figura 1).

As proantocianidinas que contêm exclusivamente unidades (epi)catequina são chamadas procianidinas e constituem o grupo mais abundante de proantocianidinas no mundo vegetal. Existem outros dois tipos de proantocianidinas, as que contêm subunidades (epi)afzelequinas e (epi)galocatequinas e que se denominam propelargonidinas e prodelfinidinas, respectivamente. As unidades componentes das proantocianidinas podem ainda sofrer substituição química por grupos acilo ou glicósidos, sendo as posições C_3 e C_5 as mais frequentemente substituídas (25).

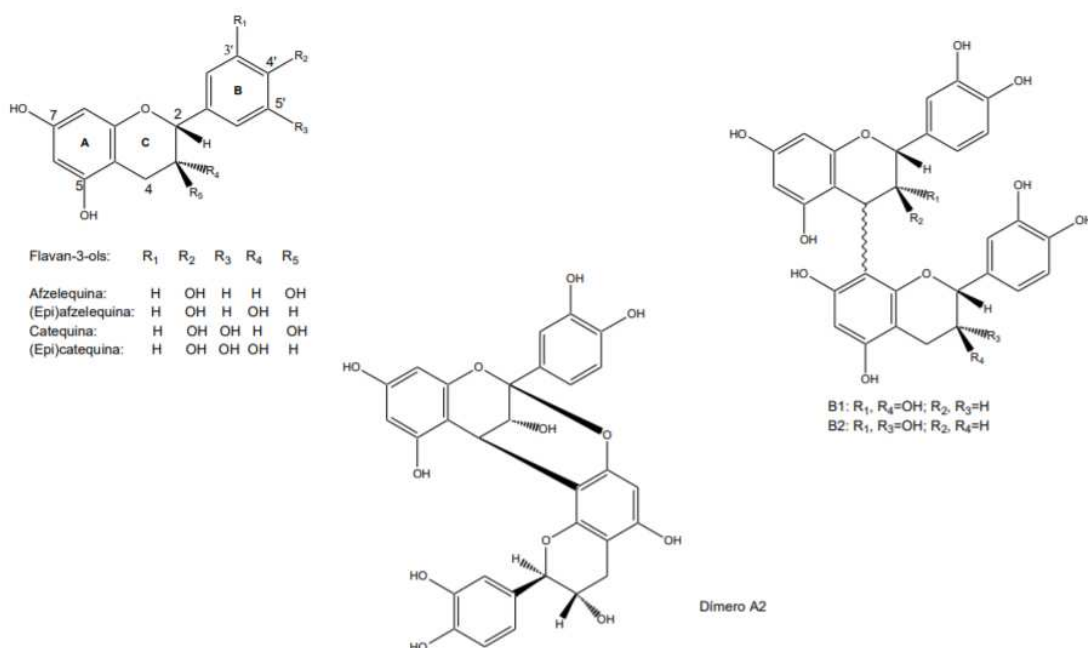


Figura 1. Estruturas químicas das proantocianidinas.

Essas moléculas são consideradas benéficas para a saúde humana, exercendo um papel na prevenção ou tratamento de muitas doenças e condições patológicas (18). Foi observado nas proantocianidinas atividades que melhoram complicações do diabetes como neuropatia, retinopatia e nefropatia, incluindo uma diminuição da glicose sérica e dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) (18). Também foi evidenciado propriedades antioxidantes nas proantocianidinas (18).

1.5 CAPACIDADES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS:

Entre as três classes de compostos secundários das plantas, os compostos fenólicos apresentam diversas propriedades biológicas benéficas à saúde humana (32,47). Esses benefícios estão sendo atribuídos aos compostos fenólicos graças a estudos epidemiológicos, clínicos e in vitro que mostram vários efeitos biológicos relacionados a ingestão desses compostos, como: atividades antioxidantes, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (12,17,20,34).

Além da capacidade antioxidante, os compostos fenólicos também possuem outras atividades biológicas importantes, como a capacidade de inibir as atividades de hidrolases de glicosídeos, bem como o processo de glicação e formação dos AGEs (2,92).

Outros estudos mostraram o potencial de algumas espécies da família Annonaceae em inibir as atividades da α -amilase e α -glicosidase (1,2). A inibição dessas hidrolases glicosídicas tem sido associada a compostos fenólicos (21,96).

O particionamento líquido-líquido de um extrato vegetal bruto é uma estratégia utilizada para concentrar esses compostos bioativos em frações orgânicas específicas e aumentar suas atividades biológicas (13). Foi observado em um outro trabalho que o extrato de acetato de etila (EtOAc), obtido pelo particionamento líquido-líquido apresentava o maior teor de compostos fenólicos e de proantocianidinas (42).

1.6 CAPACIDADES ANTIOXIDANTES:

Compostos antioxidantes são capazes de retardarem ou inibirem a oxidação de lipídios ou outras moléculas, o que acaba por evitar o início ou a propagação das reações em cadeia de oxidação. Os compostos fenólicos têm essa atividade antioxidante devido as suas propriedades de óxido-redução, que desempenham um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singlete ou decompondo os peróxidos (11,24,66,80,97).

O estresse oxidativo que é causado devido ao desbalanço entre os sistemas antioxidantes e a produção de radicais livres está relacionado com o surgimento de diversas doenças, em especial os vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares e desordens inflamatórias. Essas patologias se desenvolvem a partir de mecanismos que envolvem alterações oxidativas de moléculas críticas, incluindo proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos além das substâncias envolvidas na modulação da expressão gênica e em respostas inflamatórias (15,45).

Apesar do corpo humano ter mecanismos endógenos de defesa contra o estresse oxidativo, uma dieta contendo alguma fonte exógena de antioxidante também é fundamental. Plantas são comumente excelentes fontes de compostos antioxidantes, e seu consumo direto ou incorporado em algum outro alimento processado é uma excelente alternativa a antioxidantes sintéticos que são menos preferidos pelo consumidor devido aos seus fortes efeitos colaterais e alta toxicidade (41,56).

A busca por antioxidantes naturais para produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos vem representando um importante desafio para a pesquisa industrial nos últimos 20 anos (15).

1.7 GLICAÇÃO NÃO ENZIMÁTICA E CAPACIDADE DE INIBIR A GLICAÇÃO:

A formação de proteínas glicadas ocorre devido a uma reação não enzimática entre açúcares redutores e agrupamentos amino de proteínas por meio de uma adição nucleofílica com a formação de bases de Schiff (48). São dois os estágios da glicação. O primeiro estágio se caracteriza pela reação do grupo amino da proteína com o grupo aldeído do açúcar fisiológico para iniciar a formação da base Schiff, que, com o tempo, é rearranjado, e forma os chamados produtos Amadori. No segundo estágio, o estágio avançado, ocorre a transformação dos produtos amadori em dicarbonil intermediários reativos, como $C_3H_4O_2$ (metilglioxal). Depois de ocorrer essa transformação pode ocorrer reação com resíduos de proteínas, como lisina, arginina e $C_3H_7NO_2S$ (cisteína), formando inúmeros produtos com ligações cruzadas através de reações complexas que envolvem desidratação, oxidação, fragmentação e condensação (38). Nesse processo os danos são causados em parte pelos AGEs que podem trazer diversas consequências para o organismo (8,52). As reações não enzimáticas de proteínas levam ao acúmulo dos produtos de glicação no organismo, esse acúmulo está associado com várias condições patológicas, como o envelhecimento e o diabetes mellitus (46).

Prever a ocorrência da glicação é uma ótima estratégia para prevenir que os AGEs se formem, sendo que essas moléculas são associadas as patologias provenientes de complicações do diabetes devido sua capacidade de alterar irreversivelmente as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas biológicas (9). É possível de se encontrar no mercado diversos inibidores de glicação sintéticos, como a aminoguanidina, porém esses inibidores possuem aplicação limitada por terem toxicidade alta e apresentarem efeitos colaterais (69). Uma vez que a reação oxidativa está diretamente envolvida na formação dos AGEs, plantas que apresentam propriedades antiglicantes e antioxidantes tem a capacidade de proteger de modo mais eficiente o organismo de danos celulares (7,22,23,68,89).

2. OBJETIVO GERAL:

O objetivo deste trabalho foi de fracionar o extrato de EtOAc da casca do fruto de *A. crassiflora* para buscar uma fração bioativa enriquecida em proantocianidinas que tenha propriedades antioxidantes e antiglicantes e capacidade de inibir as hidrolases glicosídicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 MATERIAL VEGETAL:

O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autorizou o acesso e a remessa de componente do patrimônio genético, nº 010743/2015-4. Os frutos de *A. crassiflora* foram coletados nos recursos naturais do Bioma Cerrado na região norte do estado de Minas Gerais, em março de 2015, por um comerciante de frutos nativos do Cerrado localizado em Presidente Olegário, Minas Gerais, Brasil. As cascas do araticum foram cuidadosamente retiradas do fruto para serem transportadas, sob proteção da luz, para o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia. As cascas foram armazenadas a -20° C até o momento das extrações e análises. Não foi observada oxidação do material vegetal.

3.2 PREPARO DE EXTRATO ETANÓLICO:

Foi realizado o processo de maceração à temperatura ambiente e sob proteção da luz para a obtenção do extrato etanólico da casca do araticum. Para o processo de maceração foi utilizado 5,0 L de etanol 98% como solvente (proporção de 1:5 m.v⁻¹) e 1,0 kg de cascas de araticum, que foram trituradas e previamente secadas por uma estufa a 50° C durante 24 horas. Após o processo de maceração a solução com os extrativos foi filtrada e o solvente removido em um evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40° C. Para se remover a água o extrato foi congelado e liofilizado. O material vegetal após ser filtrado foi submetido a esse processo de maceração até a exaustão da extração, e por fim o extrato foi armazenado a 20° C.

3.3 PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO:

Foi solubilizado aproximadamente 20g do extrato etanólico da casca do araticum em 200,0 ml de solução metanol:água (9:1). A partição líquido-líquido foi realizada com o auxílio de um funil de separação, utilizando solventes de polaridade crescente: hexano (C₆H₁₄), diclorometano (CH₂Cl₂), EtOAc, n-butanol (C₄H₁₀O) e água (H₂O). Nesse processo foi utilizado aproximadamente 200,0ml de cada solvente para se realizar quatro extrações. Para se

remover totalmente os solventes das frações foi feita a rotaevaporação sob pressão reduzida a 40° C, em seguida, para se remover a água remanescente, as frações foram congeladas e liofilizadas e então armazenadas a -20° C.

3.4 FRACIONAMENTO DE PROANTOCIANIDINAS:

O extrato EtOAc, obtido pelo particionamento líquido-líquido, foi submetido a coluna de exclusão de tamanho (Sephadex LH-20, 500 × 22 mm, GE Health-care Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia). 3,5 g do extrato foram dissolvidos em metanol a 35% e aplicado a uma coluna Sephadex LH-20 pré-equilibrada com metanol a 35% durante 4 horas. A coluna foi então lavada com 500 mL de metanol a 35% para eluir açúcares e a maior parte dos fenólicos. Em seguida, foi utilizada acetona / água (60:40, v / v; 250 mL) para eluir o resto da fração. O eluente foi então rotaevaporado sob vácuo a 40 ° C para remover os solventes orgânicos, e liofilizado à secura. Finalmente, a fração EtOAc purificada foi analisada por LC-MS e submetidas ao HPLC para o isolamento das proantocianidinas.

3.5 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA:

Para analisar a classe de compostos presentes nas amostras, as partições foram solubilizadas em metanol na concentração de 1 mg. mL⁻¹. Foram aplicadas as soluções em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) em fase estacionária de sílica gel (60G) e indicador de fluorescência. Os dois tipos de eluentes que foram utilizados são: clorofórmio:metanol:hidróxido de amônio (proporção de 9:1:0,25) e acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (proporção de 10:1,1:1,1:2,6) (88). A detecção de proantocianidinas foi feita pelo método vanilina. Foi preparada uma solução A contendo vanilina 1% em etanol (m/v) e uma solução B contendo ácido sulfúrico 5% em etanol (v/v). A placa CCD foi borrifada com a solução A seguida da B e aquecida a 100 °C por 5 a 10 min.

3.6 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS NO EXTRATO DE ACETATO DE ETILA:

Foi feita a determinação do teor de fenólicos total de acordo com a metodologia de Morais et al. (2008), utilizando-se o reagente FolinCiocalteu, na qual envolve a redução do reagente de Folin (mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstístico) pelos compostos fenólicos (65). Para preparar o ensaio foi utilizado uma mistura de uma alíquota de 0,5 mL de solução metanólica de extrato/partição (500 µg. mL⁻¹), 2,5 mL de solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu 10% (v.v -1) e 2,0 mL de uma solução de Na₂CO₃ 7,5% (m.v -1). Os tubos de ensaio foram submetidos a um banho Maria de 5 min a 50°C. Foi feito o mesmo procedimento utilizando 0,5 mL de metanol para obtenção do branco.

O conteúdo de fenóis totais foi obtido utilizando uma curva analítica construída com padrões de ácido gálico. Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (62).

3.7 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROANTOCIANIDINAS NO EXTRATO DE ACETATO DE ETILA:

Para se determinar o conteúdo de proantocianidinas foi utilizado vanilina sulfúrica, de acordo com Moaris et al. (2008). A vanilina e o tanino condensado em Ácido sulfúrico (H_2SO_4) reagem em um mecanismo de substituição eletrofílica no anel aromático. Taninos hidrolisáveis não são possíveis de serem identificados através desta metodologia, uma vez que em suas estruturas de ressonância, os carbonos na posição orto em relação à carbonila apresentam densidade de carga positiva para os taninos hidrolisáveis, o que impede que ocorra uma substituição eletrofílica no anel aromático (77). Foram adicionados a um tubo de ensaio 1,0 mL de solução metanólica de extrato/partição ($100 \mu\text{g. mL}^{-1}$) e 2,0 mL de solução de vanilina 0,5% (m.v $^{-1}$) em ácido sulfúrico 70% (m.v $^{-1}$). Em seguida a mistura foi colocada em banho a 50 ° C por 15min. Foi feito o mesmo procedimento utilizando 1,0 mL de metanol para obtenção do branco.

Foi determinado o teor de proantocianidinas por meio de uma curva analítica construída com padrões de catequina. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como miligramas equivalentes de catequina por grama de amostra (62).

3.8 DPPH:

Para realizar o procedimento foi utilizado o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) como descrito no método de Yildirim, Mavi e Kara (2001) modificado. Foi observado na análise da capacidade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH que a reação dos compostos fenólicos e o do radical pode ocorrer por meio da transferência de hidrogênio atômico ou por perda sequencial de próton na transferência de elétron (57). Foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) o extrato bruto e as partições orgânicas. Foi iniciado o ensaio com 250 μL de extrato/partição solubilizado em 750 μL de solução metanólica de DPPH ($0,06 \text{ mmol. L}^{-1}$). A mistura contendo extrato/partição foi incubada a 30° C, na ausência de luz, por 20 min. A redução na absorbância da mistura foi medida em espectrofotômetro a 517 nm. O controle foi feito substituindo o extrato/partição por metanol. O branco foi realizado substituindo a solução de DPPH por metanol. O ácido ascórbico foi utilizado como controle

positivo. O cálculo da porcentagem da capacidade antioxidante (CA), que corresponde à porcentagem de DPPH “sequestrado”, é determinada pela Equação 1 (94).

$$CA = (\%) = \left(\frac{Abs\ controle - (Abs\ amostra - Abs\ branco)}{Abs\ controle} \right) \cdot 100$$

Onde: Abs controle é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH, Abs amostra é a absorbância da mistura (DPPH + amostra), Abs branco é a absorbância da amostra em metanol.

Todas as análises foram realizadas em triplicata com diferentes concentrações de cada amostra para a determinação dos valores de IC50.

3.9 ORAC:

A capacidade antioxidante foi avaliada de acordo com a eficácia de absorção do radical peroxil do extrato/partições (70). Para Prior (2003), a capacidade antioxidante pelo método de absorção do radical peroxil (ORAC) é baseada na inibição da oxidação do radical peroxil, para iniciar a reação o composto 2-amidino-propano dihidrocloro sofre decomposição térmica, a adição de fluoresceína é necessária para controle da quantidade de antioxidante, visto que sua fluorescência decai ao longo do tempo de acordo com a ausência e presença de antioxidante. Foram diluídos em DMSO na concentração de 20 µg. mL⁻¹ o extrato bruto e as partições orgânicas. Os reagentes foram preparados em tampão fosfato a 75 mmol. L⁻¹, pH 7.4. Primeiramente foram misturados 25 µL de extrato/partição a 150 µL de fluoresceína (0,085 nmol. L⁻¹) e incubados por 15 min à temperatura ambiente então, 30 µL da solução de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloro (AAPH) deu início à reação. Foi utilizado um espectrofluorímetro para medir a intensidade de fluorescência (485 nmex/528 nmem) e a cada 1 min e 30 s foi verificada, por um período de 90 min. Foi realizado o branco substituindo o extrato/partição por tampão fosfato. Para o controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico.

Para se medir a perda de fluorescência da fluoresceína foi utilizado o cálculo da área sob curva e a capacidade antioxidante foi determinada por meio de uma curva analítica construída com ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). As análises foram todas feitas em triplicata e os resultados foram expressos como µmol equivalente de Trolox por grama de amostra.

3.10 INIBIÇÃO DA α -AMILASE:

Para se analisar a capacidade do extrato de EtOAc da casca do araticum e suas partições orgânicas em inibir a atividade da α -amilase foi utilizado o método GALG2CNP modificado, utilizando o substrato α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltosídeo (GAL-G2- α -CNP) e uma fração de saliva enriquecida da enzima α -amilase (f-AS) (31,82). Foi coletado saliva humana pelo método de cuspe para se preparar o f-AS, a saliva foi então armazenada a -20° C por um período de 48 h (parecer do comitê de ética no. 407.597). Em seguida a saliva foi descongelada e centrifugada a 12000 xg por 10 min a 20 ° C. Então foi fracionado o sobrenadante em uma coluna de Q-Sepharose, utilizando como fase móvel um tampão contendo 50 mmol. L⁻¹ de Tris-HCl (pH 8,0), 10 mmol. L⁻¹ de EDTA e 10 mmol. L⁻¹ de EGTA. O volume de exclusão da coluna de Q-Sepharose foi dialisado em tampão de bicarbonato de amônio (50 19 mmol.L-1 , pH 7,0), liofilizado e solubilizado em 50 mmol.L-1 de tampão ácido 2-(Nmorfolino)-etanossulfônico (MES), contendo 5 mmol.L-1 de cloreto de cálcio, 140 mmol.L-1 de tiocianato de potássio e 300 mmol.L-1 de cloreto de sódio (pH 6,0). Então foram dissolvidas em DMSO as amostras de extrato/partições e incubadas com f-AS (proporção de 1:10) por um período de 30 min a 37 ° C. Para iniciar a reação foi adicionado 320 μ L do substrato GAL-G2- α -CNP (12 mmol.L-1) e os valores de absorbâncias foram medidos a 405 nm, durante 3 min, com intervalo de 1 min, a 37° C. Para o controle foi substituído o extrato/partição por tampão MÊS. Para o controle positivo foi utilizada a acarbose.

Os ensaios foram todos realizados em triplicata e o resultado apresentado como porcentagem de inibição α -amilase, calculado por meio da Equação 4. As Equações 2 e 3 determinaram a atividade da enzima em U.mL-1 e %, respectivamente, e foram utilizadas no cálculo da inibição (Equação 3).

$$\text{Atividade da } \alpha - \text{amilase } \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{\left[\left(\frac{\Delta Abs}{min} \right) \cdot Vf \cdot Fd \right]}{\xi \cdot Vs \cdot l} \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Atividade da } \alpha - \text{amilase } (\%) = \frac{A_{amostra}}{A_{controle}} \cdot 100 \quad \text{Equação 3}$$

$$\text{Inibição da } \alpha - \text{amilase } (\%) = 100 - (\text{Atividade da } \alpha - \text{amilase em } \%) \quad \text{Equação 4}$$

Onde: $\Delta Abs/min = [(Abs3-Abs1)/2]$ é a diferença de absorbância por min (Abs = absorbância; 1 e 3 = min); Vf é o volume total da reação (328 μ L); Vs é o volume de amostra (extrato/fração mais enzima α -amilase, 8 μ L); Fd é o fator de diluição da saliva (82); ξ é o coeficiente de absortividade do 2-cloro-p-nitrofenol; l é o comprimento do percurso da luz

(0,97); A controle é a atividade da α -amilase e A amostra é a atividade da α -amilase na presença do extrato/fração.

Todas as análises foram realizadas em triplicata com diferentes concentrações de cada amostra para a determinação dos valores de IC50.

3.11 INIBIÇÃO DA α -GLICOSIDASE:

A análise para definir a capacidade de inibição da α -glicosidase do extrato de EtOAc da casca do araticum e suas partições orgânicas foi realizada utilizando-se o substrato 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (p-NPG) (78) e uma fração enriquecida da enzima α -glicosidase (f-AG) (SigmaAldrich I-1630) (86). Foi homogeneizado em 3 mL de solução aquosa de cloreto de sódio (0,9% m.v⁻¹) 200 mg de pó cetônico de intestino de rato para o preparo da f-AG. Foi feita a centrifugação a 12000 xg por 30min no homogeneizado para separar o sobrenadante(f-AG) que foi utilizado no ensaio. Após isso, as amostras de extrato/partições foram dissolvidas em DMSO e incubadas com a f-AG e 1,5 mmol. L⁻¹ de glutatona reduzida (diluída em tampão fosfato a 50 mmol.L⁻¹, pH 6,8) durante 20 min a 37° C. Então foi iniciado o processo da reação pela adição do substrato p-NPG(4 mmol.L⁻¹, em tampão fosfato de sódio a 50 mmol.L⁻¹, pH 6,8), medindo-se os valores de absorbâncias a 405 nm, durante 30 min, com intervalo de 5 min, a 37° C. Foi realizado o controle utilizando o tampão fosfato para substituir o extrato/partição, e para controle positivo foi utilizado a acarbose. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O resultado é dado em porcentagem de inibição da α -glicosidase, calculado por meio da Equação 5.

$$\text{Inibição da } \alpha - \text{glicosidas} = \left(\frac{(\text{ASC controle} - \text{ASC amostra})}{\text{ASC controle}} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde: ASC controle é a área sob a curva na ausência de extrato/partição, e ASC amostra é a área sob a curva na presença de extrato/partição.

Todas as análises foram realizadas em triplicata com diferentes concentrações de cada amostra para a determinação dos valores de IC50.

3.12 INIBIÇÃO DA GLICAÇÃO:

Neste ensaio foram diluídos em tampão fosfato (200 mmol. L⁻¹, pH 7,4) 50 mg. mL⁻¹ de BSA (Albumina Sérica Bovina) e 1,25 mol. L⁻¹ de frutose. Os extratos/partições foram diluídos em DMSO. Então foram encubados à 37° C por 72 horas na ausência de luz. Em seguida se adicionou em cada tubo 1,6 mL de ácido tricloroacético 20% (m. v⁻¹). Após isso os tubos foram centrifugados a 10000 xg por 10 min e o pellet foi ressuspensionado em 1,6 mL de

tampão fosfato (200 mmol. L⁻¹, pH 7,4). Foi avaliada a redução da fluorescência do BSA ao se ligar ao açúcar (frutose) em espectrofluorímetro, com excitação a 350 nm e emissão a 420 nm (81). Para o controle foi substituído o extrato/partição por DMSO. Para o branco, se substituiu a frutose por tampão fosfato (200 mmol. L⁻¹, pH 7,4) e o extrato/partição por DMSO. Para o controle positivo foi utilizado a quercetina. Foi utilizada a Equação 6 para realizar o cálculo da porcentagem de inibição de glicação (IG).

$$IG (\%) = 100 - \left(\frac{(IF_{amostra} - IF_{branco})}{(IF_{controle} - IF_{branco})} \cdot 100 \right) \quad \text{Equação 6}$$

Sendo: IF amostra a intensidade de fluorescência na presença de extrato/partição, IF branco a intensidade de fluorescência na ausência de frutose e extrato/partição, e IF controle a intensidade de fluorescência na ausência de extrato/partição.

Todas as análises foram realizadas em triplicata com diferentes concentrações de cada amostra para a determinação dos valores de IC50.

4.RESULTADOS:

4.1 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA:

Os números encontrados nas placas de cromatografia de camada delgada (Figura 2) correspondem ao extrato de EtOAc, que após passar pela coluna de exclusão, foi coletada em diversos frascos com cada um contendo 5ml da solução, que foram enumerados, e então aplicados as placas de cromatografia de camada delgada de 3 em 3. A partir da observação do resultado apresentado na Figura 2, os frascos que então continham o extrato de EtOAc foram agrupados em 12 frações de acordo com seus perfis semelhantes.

4.2 CONTEÚDO TOTAL DE FENÓIS E PROANTOCIANIDINAS:

A fração F7 mostrou o maior teor fenólico total assim como o maior teor de proantocianidinas, seguida pela fração F6 (Tabela 2). Baseado nesse resultado F7 foi escolhida para a realização dos demais ensaios.

4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE:

A capacidade antioxidante foi determinada a partir do método de ORAC e do método DPPH. Para os dois métodos a quercetina foi utilizada como controle positivo. Para o método ORAC a quercetina alcançou a maior capacidade antioxidante, seguida por F7 que também apresentou um alto valor ORAC sendo superior ao valor apresentado pelo extrato de EtOAc (Figura 3A). Para o método DPPH o resultado foi semelhante, com a quercetina

apresentando a maior capacidade antioxidante, com os menores valores de IC50 seguida por F7 e depois pelo extrato de EtOAc (Figura 2B).

4.4 INIBIÇÃO DAS HIDROLASES GLICOSÍDICAS:

Para se determinar a capacidade de inibição das hidrolases glicosídicas, foi utilizado Acarbose como controle positivo. Para a inibição de α -amilase é possível observar que F7 apresentou valor de IC50 menor do que o extrato de EtOAc, e muito próximo da Acarbose, demonstrando um alto potencial inibitório de α -amilase (Figura 4A). Para α -glicosidase F7 não foi tão eficiente como Acarbose, porém ainda apresentou um valor de IC50 menor do que o extrato de EtOAc (Figura 4B).

4.5 INIBIÇÃO DA GLICAÇÃO:

Para determinar a inibição da glicação, foi utilizado novamente a quercetina como controle positivo. No modelo BSA-Fructose F7 apresentou o menor valor de IC50, logo seguida pela quercetina, e então pelo extrato de EtOAc, o que demonstra uma capacidade muito alta de inibir a glicação na frutose (Figura 5A). Para os modelos BSA-Metilglioxal (Figura 5B) e Arginina-metilglioxa (Figura 5C), quercetina apresentou a maior capacidade antiglicante, com os menores valores de IC50, seguida por F7 e depois pelo extrato de EtOAc.

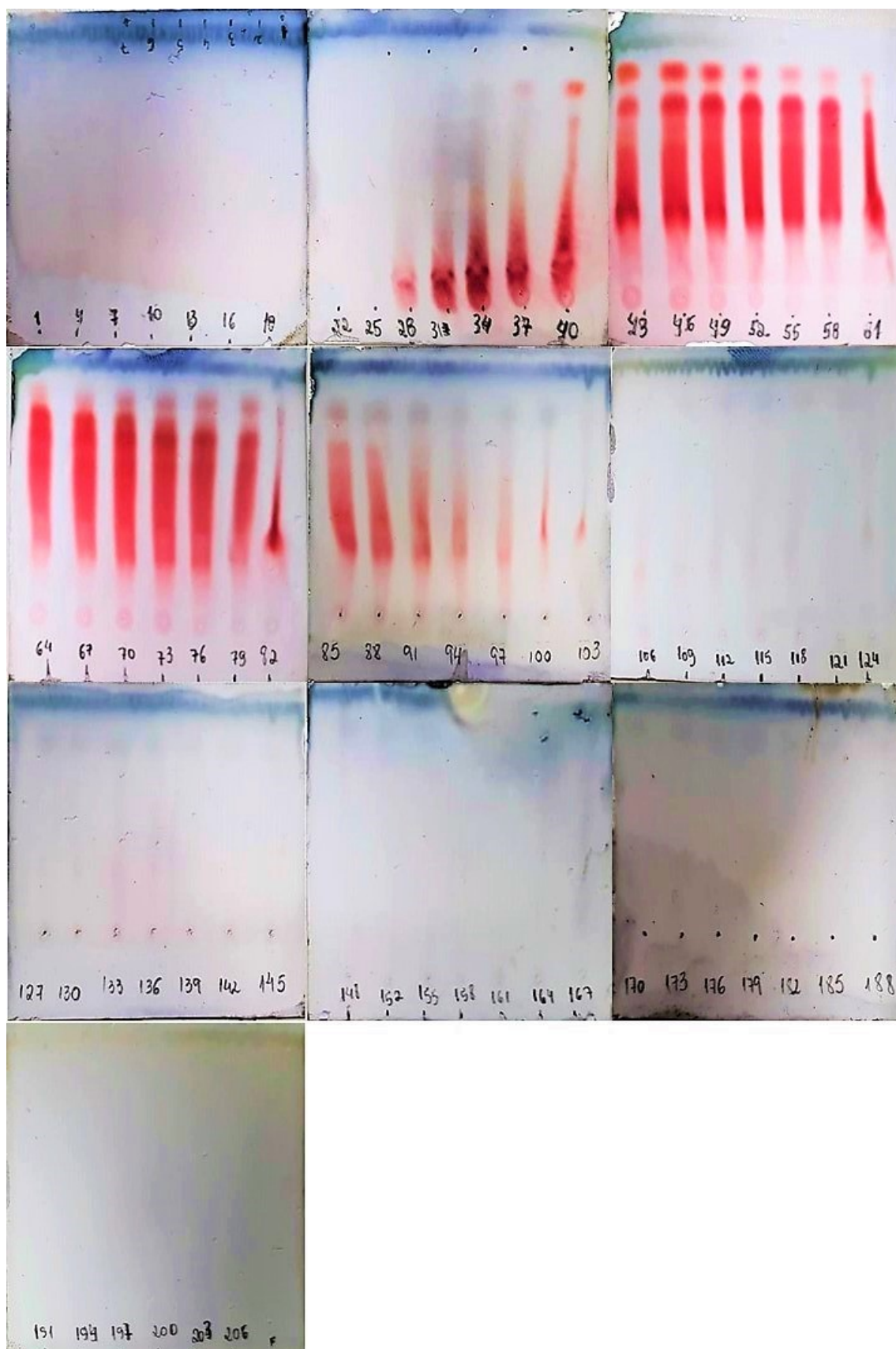


Figura 2. Soluções aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) em fase estacionária de sílica gel (60G) com o indicador de fluorescência.

Rendimento da fração EtOAc do extrato etanólico da casca de frutos de *A. crassiflora*: 25,5184%.

Tabela 1. Rendimento das frações da fração EtOAc da casca de frutos de *A. crassiflora*:

Fração	Rendimento (%)
1	0.077766
2	0.180276
3	1.392718
4	5.266879
5	3.700954
6	24.62001
7	14.06504
8	1.661364
9	0.176741
10	0.392365
11	0.106045
12	0.466596

Tabela 2. Teores totais de fenóis e proantocianidinas das frações de casca de frutos de *A. crassiflora*. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Frações	Teor fenólico total (mg GAE g ⁻¹)	Teor de proantocianidinas (mg CE g ⁻¹)
F1	205.5 \pm 15.1	385.3 \pm 19.5
F2	483.9 \pm 52.7	720.4 \pm 66.8
F3	446.9 \pm 33.4	650.2 \pm 54.2
F4	468.9 \pm 24.2	840.2 \pm 95.3
F5	502.1 \pm 16.4	902.7 \pm 126.5
F6	545.1 \pm 65.8	1102.2 \pm 135.7
F7	660.6 \pm 71.9	1295.7 \pm 91.4
F8	455.8 \pm 32.5	878.3 \pm 165.8

F9	448.8 ± 22.3	778.4 ± 116.0
F10	384.1 ± 53.6	628.8 ± 49.0
F11	232.8 ± 32.4	443.0 ± 31.8
F12	151.3 ± 14.0	278.3 ± 31.8
EtOAc	497.9 ± 38.7	757.5 ± 12.0

Tabela 3. Proantocianidinas identificadas na fração de EtOAc da casca de fruta de *A. crassiflora* por HPLC-ESI-MS / MS (modo negativo).

Composto identificado	Tempo de retenção (min)	Formula	Massa calculada	m/z	Erro (ppm)	m / z de fragmentos	Referências
Procianidina do tipo B (dímero)	2.6 - 5.0	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ ⁻ [M-H] ⁻	577.1351 [M-H] ⁻	577.1354 [M-H] ⁻	0.51	451, 407, 339, 289, 245, 243, 205, 203, 161, 125	Justino 2016; procyanidins
Procianidina do tipo B (trímero)	3.0 - 4.8	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈ ⁻ [M-H] ⁻	865.1985 [M-H] ⁻	865.1984 [M-H] ⁻	-0.11	695, 577, 425, 363, 289, 287, 204, 203, 125	Procyanidin
Procianidina do tipo B (tetrâmero)	3.0 - 4.7	C ₆₀ H ₄₉ O ₂₄ ⁻ [M-H] ⁻	1153.2619 [M-H] ⁻	1153.2614 [M-H] ⁻	-0.43	863, 739, 577, 575, 545,	Procyanidin
		C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂ ⁻ [M-2H] ²⁻	576.1279 [M-2H] ²⁻	576.1275 [M-2H] ²⁻	-0.34	449, 407, 339, 289, 245, 243, 205, 203, 125	
Procianidina do tipo B (pentâmero)	3.7 - 4.7	C ₇₅ H ₆₁ O ₃₀ ⁻ [M-H] ⁻	1441.3253 [M-H] ⁻	1441.3255 [M-H] ⁻	0.13	720, 693, 577, 575, 451,	Procyanidin
		C _{37.5} H ₃₀ O ₁₅ ⁻ [M-2H] ²⁻	720.1590 [M-2H] ²⁻	720.1573 [M-2H] ²⁻	-0.27	407, 289, 217, 125	

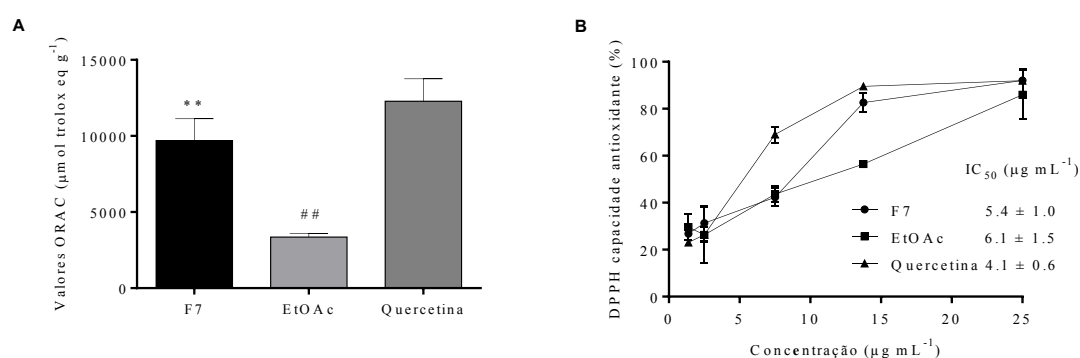


Figura 3. Análise da capacidade antioxidante das frações enriquecidas com proantocianidinas e EtOAc da casca de frutos de *A. crassiflora* e da quercetina pelos métodos ORAC (A) e DPPH (B). Valores (média ± desvio padrão) são expressos como μmol equivalentes de trolox g⁻¹ (A), porcentagem de atividade antioxidante e valores de IC₅₀ (B). Nota: F7: fração enriquecida com

proantocianidinas. ** $p < 0,01$ versus EtOAc; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ versus quercetina (controle).

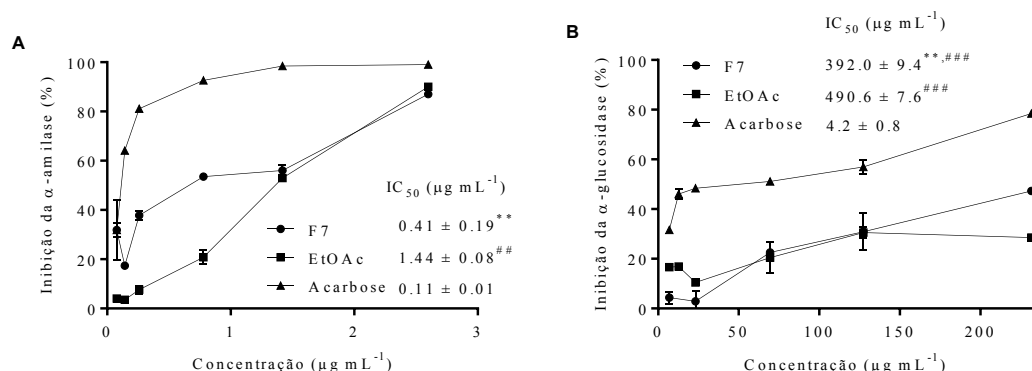


Figura 4. Análise das atividades inibitórias de α -amilase (A) e α -glucosidase (B) das frações enriquecidas em proantocianidinas e EtOAc da casca de frutos de *A. crassiflora*. Valores expressos em percentagem da inibição enzimática e valores de IC₅₀. Valores expressos como média \pm desvio padrão. Nota: F7: frações enriquecidas com proantocianidinas. ** $p < 0,01$ versus EtOAc; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ versus acarbose (controle).

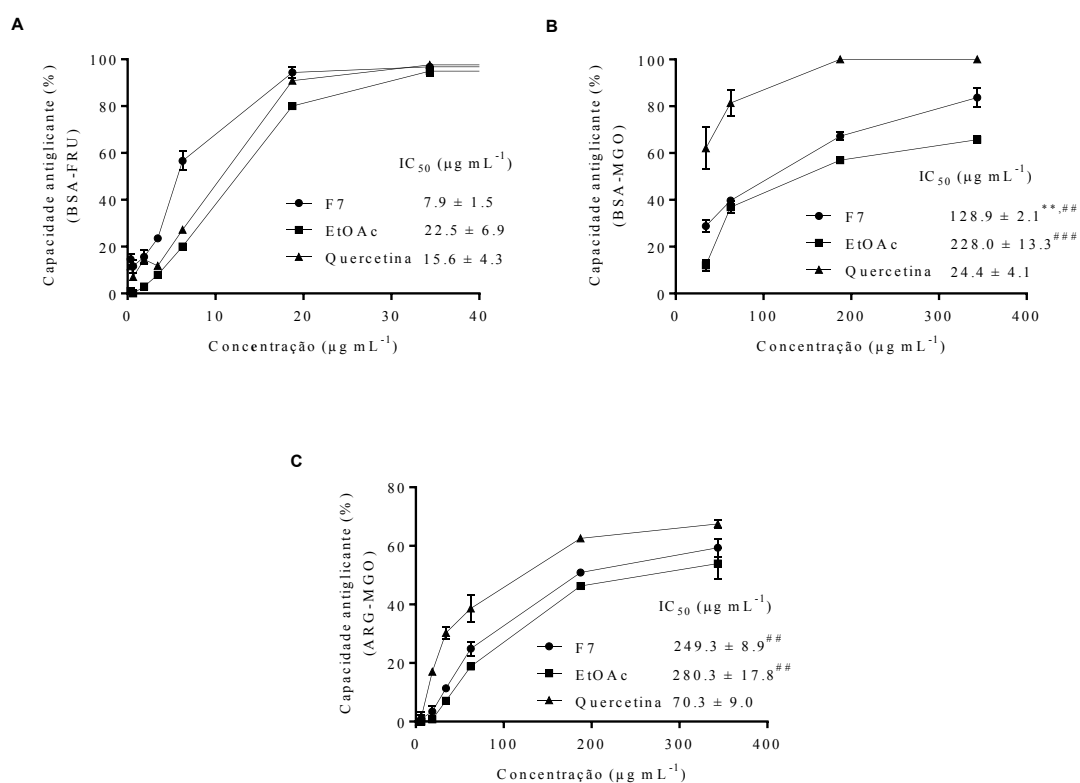


Figura 5. Análise da atividade inibitória da glicação das frações enriquecidas com proantocianidinas e da fração EtOAc da casca de frutos de *A. crassiflora* e quercetina em BSA-

frutose (BSA-FRU) (A), BSA-metilglioxal (BSA-MGO) (B) e arginina modelos -metilglioxal (ARG-MGO) (C). Valores (média \pm desvio padrão) são expressos como uma porcentagem da inibição da glicação e valores de IC50. Nota: F7: fração enriquecida com proantocianidinas. ** p <0,01 versus EtOAc; ## p <0,01 e ### p <0,001 versus quercetina (controle).

5. DISCUSSÃO:

A procura por compostos fenólicos vem ganhando importância devido a sua alta capacidade antioxidante, atividade de inibição enzimática e baixa toxicidade quando comparado com compostos sintéticos (29,58,73). Nesse estudo foi fracionado o extrato de EtOAc da casca do araticum (*Annona crassiflora*). A casca das frutas são sua maior fonte de compostos fenólicos (70). O uso do etanol (C₂H₅OH) permite o isolamento de substâncias polares e semipolares, como flavonóis, alcaloides, flavonas, polifenóis e taninos (19,85). Foram encontradas frações enriquecidas com proantocianidinas que apresentavam atividade antioxidante e antiglicante como o esperado, sendo a fração de EtOAc que apresentou o melhor resultado. Em outro estudo foi observado que as frações de EtOAc apresentavam alto conteúdo de compostos fenólicos o que poderia explicar sua maior capacidade antioxidante em relação as outras frações (43). A análise HPLC-ESI-MS / MS identificou no extrato de EtOAc procianidinas (Tabela 3). As procianidinas são proantocianidinas que contêm exclusivamente unidades (epi)catequina e constituem o grupo mais abundante de proantocianidinas no mundo vegetal (25). Pode se afirmar, portanto, que a partir da análise HPLC-ESI-MS / MS o isolamento das proantocianidinas no extrato purificado de EtOAc foi um sucesso.

Em outro trabalho realizado também foi observado que o extrato de EtOAc da casca do araticum possui o maior teor de compostos fenólicos, como flavonoides e proantocianidinas e os menores valores de IC50 utilizando o método DPPH, o que corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho, além disso também foi observado que o extrato de EtOAc era menos citotóxico do que o extrato bruto de etanol (26). Para todos os ensaios foi utilizada a fração F7 pois foi essa fração que apresentou o maior teor de proantocianidinas (Tabela 2).

Foi observado através do método ORAC (Figura 2 A) e do método DPPH (Figura 2 B) que a fração apresenta um grande potencial antioxidante, alcançando valores próximos a quercetina, um flavonoide com atividade antioxidante que é comumente comercializado e foi utilizado como controle nas análises. O potencial antioxidante dos polifenóis está associado com propriedades redutoras do hidrogênio ou de agentes doadores de elétron, bem como a sua

capacidade de formar um radical estável derivado de antioxidantes (71). Foi encontrado em outro estudo uma grande capacidade antioxidante e um alto teor de compostos fenólicos na casca do araticum (72) o que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho. O presente trabalho mostra que através do particionamento do extrato de EtOAc foi possível chegar a uma fração enriquecida com proantocianidinas o que contribui para o aumento na capacidade antioxidante.

A busca de compostos bioativos naturais com baixa toxicidade e que apresentem capacidades antioxidantes e atividades inibitórias enzimáticas para o controle e tratamento do diabetes mellitus e suas complicações, vem ganhando bastante importância quando comparados com compostos sintéticos (44,67,73). Sabe-se bem que a peroxidação lipídica aumenta sob a condição patológica do diabetes mellitus tipo 2, devido à produção de radicais livres induzida pela hiperglicemia, que causa a peroxidação lipídica nas lipoproteínas (16). A presença de compostos antioxidantes poderia reduzir a peroxidação lipídica, controlando a produção de espécies reativas de oxigênio (44). Já foi demonstrado em estudos anteriores que o potencial de ácido clorogênico e flavonóides, como procianidinas, quercetina e rutina, que estão presentes no extrato EtOAc, na redução da peroxidação lipídica e aumento da capacidade antioxidante em animais diabéticos (4,28,33,93).

Outros estudos já apontaram para o potencial de algumas espécies da mesma família do araticum em inibir a atividade da α -amilase e α -glicosidase (2,29) o que está de acordo com o resultado encontrado no presente estudo. A inibição dessas hidrolases glicosídicas tem sido associado com compostos fenólicos (21,96). As proantocianidinas são conhecidas por seu potencial de inibição de α -amilase e α -glicosidase (21,35,40,95). A estrutura dessas biomoléculas apresenta muitos grupos fenólicos, que podem contribuir para a inibição enzimática, uma vez que a diminuição da atividade enzimática depende do número e da posição dos grupos hidroxila dos fenólicos (73). Já foi apontado por outros trabalhos que as plantas utilizadas no tratamento do diabetes têm a capacidade de inibir α -amilase, α -glicosidase e alta capacidade antioxidante (30,92). Uma interessante estratégia para o controle da hiperglicemia pós-prandial, que é um fator de risco para complicações micro e macrovasculares no diabetes mellitus, é a inibição das hidrolases glicosídicas. O presente estudo demonstrou que a fração enriquecida em proantocianidinas F7 apresenta capacidade de inibir as atividades de α -amilase (Figura 3 A) e α -glucosidase (Figura 3 B). A inibição dessas enzimas digestivas está relacionada com o controle da hiperglicemia pós-prandial (59). Vários compostos fenólicos têm sido relatados como inibidores de glicosídeos hidrolases devido à sua capacidade de se ligarem a

proteínas (58), como os ácidos clorogênico e cafeico, catequina, procianidinas, quercetina, quercetina-glicosídeo e rutina (54,83), que podem ter contribuído às capacidades inibitórias das frações de EtOAc.

Outra característica das frações com muitos compostos fenólicos é a inibição da glicação das proteínas (91,92). A maioria dos compostos fenólicos, especialmente flavonóides e proantocianidinas, como o kaempferol-3-rutinosídeo e a procianidina B2 (Tabela 3), são capazes de inibir o processo de glicação (50,63,91,92). Foi observado que a fração F7 enriquecida com proantocianidinas tem capacidade de inibir o processo de glicação (Figura 4). A análise da inibição da glicação usando três métodos diferentes mostra os efeitos anti-glicação dessas frações enriquecidas com polifenóis, que atuam no meio e em todos os estágios da glicação da proteína (90). Foram testadas suas atividades inibitórias em BSA-frutose (Figura 8 A), BSA-metilglioxal (Figura 8 B) e arginina modelos -metilglioxal (Figura 4 C). A frutose é formada através da oxidação do sorbitol em órgãos específicos como lentes oculares e nervos periféricos e, quando o nível de glicose é elevado, um acúmulo de frutose pode ocorrer nesses órgãos (60). Tanto a frutose como os produtos de oxidação, como o metilglioxal, podem reagir com a proteína para formar AGEs (90). A arginina é um dos principais alvos da glicação das proteínas por carbonilas reativas, que reagem com o grupo guanidina da arginina para gerar AGE (64). É possível observar pelos valores de IC₅₀ que F7 alcançou resultado excepcional na inibição da glicação em BSA-frutose (Figura 4 A) mostrando ser ainda mais eficiente que a quercetina. Estudos anteriores mostraram que os flavonóides e as proantocianidinas, como a quercetina, a rutina, a catequina, a procianidina B2, bem como os ácidos fenólicos, como os ácidos clorogênico e cafeico, são capazes de inibir o processo de glicação (58,63,75,90,92). Estes compostos suprimem a formação de AGEs, capturando precursores como os 1,2-dicarbonilos ou interagindo com a glicose, impedindo a sua ligação às proteínas (58,61). Assim, a inibição da glicação proteica mediada pela frutose e seus produtos oxidantes é importante para a prevenção das complicações do diabetes.

6. CONCLUSÃO:

Em resumo, a fração proveniente do extrato de EtOAc, enriquecidas com proantocianidinas, do extrato etanólico da casca do araticum, apresentou uma grande capacidade antioxidante, grande potencial de inibição contra as enzimas α -amilase e α -glicosidase e capacidade de inibição da glicação proteica. Através da análise por HPLC-ESI-MS / MS foi possível identificar 4 tipos de proantocianidinas que são as moléculas bioativas

responsáveis pelas atividades biológicas encontradas no presente trabalho. Esse estudo mostra que na casca do fruto de *A. crassiflora* se encontram moléculas bioativas capazes de trazer grandes benefícios a saúde humana, sendo capazes até mesmo de ajudar a controlar e tratar de diabetes, que é uma doença que vem afetando milhões de pessoas, onde seu principal tratamento se dá por meio de compostos sintéticos com grande toxicidade que trazem efeitos colaterais indesejáveis. Assim, os resultados apresentados neste estudo com casca de araticum podem agregar valor sugerindo vantagens do uso de um subproduto de frutos de *A. crassiflora* para identificar e isolar fitoquímicos específicos para aplicação em suplementos nutracêuticos, aditivos alimentares, novos alimentos e produtos farmacêuticos. Também espera-se que esse estudo mostre a importância da espécie *A. crassiflora* para o ser humano e que chame a atenção para a sua conservação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 1- ADEFEGHA, Stephen A.; OYELEYE, Sunday I.; OBOH, Ganiyu. Distribution of Phenolic Contents, Antidiabetic Potentials, Antihypertensive Properties, and Antioxidative Effects of Soursop (*Annona muricata* L.) Fruit Parts In Vitro. **Biochemistry Research International**, v. 2015, p. 1–8, 2015.
- 2- ADEFEGHA, Stephen Adeniyi; OBOH, Ganiyu. Inhibition of key enzymes linked to type 2 diabetes and sodium nitroprusside-induced lipid peroxidation in rat pancreas by water extractable phytochemicals from some tropical spices. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 7, p. 857–865, 2012.
- 3- AERTS, Rob J.; SNOEIJER, Wim; VAN DER MEIJDEN, Eddy; et al. Allelopathic inhibition of seed germination by Cinchona alkaloids? **Phytochemistry**, v. 30, n. 9, p. 2947–2951, 1991.
- 4- ALAM, Md. Maroof; MEERZA, Dilnasheen; NASEEM, Imrana. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice. **Life Sciences**, v. 109, n. 1, p. 8–14, 2014.
- 5- ALMEIDA, L. F. P. Propagação por enxertia de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) e Atemoia (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill.) em diferentes porta-enxertos de

Annonaceae. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

6- ALMEIDA, S. P.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, J. A. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado**, ecologia e flora. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008.

7- BABU, Pon Velayutham Anandh; SABITHA, Kuruvimalai Ekambaram; SHYAMALADEVI, Chennam Srinivasulu. Effect of green tea extract on advanced glycation and cross-linking of tail tendon collagen in streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 280–285, 2008.

8- BAILEY, Allen J; PAUL, Robert Gordon; KNOTT, Lynda. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 106, n. 1–2, p. 1–56, 1998.

9- BARBOSA, Júnia H. P.; OLIVEIRA, Suzana L.; SEARA, Luci Tojal e. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940–950, 2008.

10- BERNARDES, T.; ESTRÊLA, C.; NAVES, R.; REZENDE, C.; MESQUITA, M. A.; PIRES, L. EFEITO DO ARMAZENAMENTO E DE FITOHORMÔNIOS NA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE ARATICUM (*Annona crassiflora* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 37, n. 3, p. 163–168, 15 out. 2007.

11- BRENNA, Oreste V.; PAGLIARINI, Ella. Multivariate Analysis of Antioxidant Power and Polyphenolic Composition in Red Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4841–4844, 2001.

12- CANTOS, Emma; ESPÍN, Juan Carlos; TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A. Varietal Differences among the Polyphenol Profiles of Seven Table Grape Cultivars Studied by LC–DAD–MS–MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 20, p. 5691–5696, 2002.

13- CHENG, Qian; CAI, Shengbao; NI, Dejiang; et al. In vitro antioxidant and pancreatic α -amylase inhibitory activity of isolated fractions from water extract of Qingzhuan tea. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 928–935, 2015.

- 14- CORDEIRO, M. C. R.; PINTO, A. C. Q.; ANDRADE, S. R. M. Capítulo 7 - Uses. In: PINTO, A. C. Q.; CORDEIRO, M. C. R.; PINTO, A. C. Q.; ANDRADE, S. R. M.; FERREIRA, F. R.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E.; KINPARA, D. I. *Annona species*. Internacional Center of Under Utilised Crops, University of Southampton, Southampton, UK, 2005.
- 15- CROTEAU R, KUTCHAN TM, Lewis NG 2000, Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 1250-1318.
- 16- DAVÌ, Giovanni; FALCO, Angela; PATRONO, Carlo. Lipid Peroxidation in Diabetes Mellitus. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 1–2, p. 256–268, 2005.
- 17- DE BEER, Dalene; JOUBERT, Elizabeth; GELDERBLUM, Wentzel C. A.; et al. Antioxidant Activity of South African Red and White Cultivar Wines: Free Radical Scavenging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 902–909, 2003.
- 18- DE LA IGLESIA, Rocío; MILAGRO, Fermín I.; CAMPIÓN, Javier; et al. Healthy properties of proanthocyanidins. **BioFactors**, v. 36, n. 3, p. 159–168, 2010.
- 19- DE MONTE, Celeste; CARRADORI, Simone; GRANESE, Arianna; et al. Modern extraction techniques and their impact on the pharmacological profile of *Serenoa repens* extracts for the treatment of lower urinary tract symptoms. **BMC Urology**, v. 14, n. 1, 2014.
- 20- DELMAS, Dominique; JANNIN, Brigitte; LATRUFFE, Norbert. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, n. 5, p. 377–395, 2005.
- 21- DEY, Baishakhi; MITRA, Analava. Chemo-profiling of eucalyptus and study of its hypoglycemic potential. **World Journal of Diabetes**, v. 4, n. 5, p. 170, 2013.
- 22- DURAISAMY, Yasotha; GAFFNEY, John; SLEVIN, Mark; et al. Aminosalicic acid reduces the antiproliferative effect of hyperglycaemia, advanced glycation endproducts and glycated basic fibroblast growth factor in cultured bovine aortic endothelial cells: comparison with aminoguanidine. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 246, n. 1–2, p. 143–153, 2003.
- 23- FARRAR, Johnetta L.; HARTLE, Diane K.; HARGROVE, James L.; et al. Inhibition of protein glycation by skins and seeds of the muscadine grape. **BioFactors**, v. 30, n. 3, p. 193–200, 2007.

- 24- FENNEMA, O. R. Química de los alimentos. 2. Ed. Zaragoza: Ed. **Acribia S. A.**, 2000. p. 1258.
- 25- FIGUEIREDO, Paulo; ALBUQUERQUE, Filipa; ROMEIRO, Sara. PROANTOCIANIDINAS NA DIETA HUMANA. INFLUÊNCIA NA PREVENÇÃO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES. 2013. Disponível em: <<https://repositorio-cientifico.uatlantica.pt/handle/10884/1347>>. Acesso em: 2 Julho 2019.
- 26- FORMAGIO, A.S.N.; VIEIRA, M.C.; VOLOBUFF, C.R.F.; et al. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 4, p. 308–315, 2015.
- 27- FRAENKEL, G. S. The Raison d’Etre of Secondary Plant Substances: These odd chemicals arose as a means of protecting plants from insects and now guide insects to food. **Science**, v. 129, n. 3361, p. 1466–1470, 1959.
- 28- GANESHPURKAR, Aditya; SALUJA, Ajay K. The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 2, p. 149–164, 2017.
- 29- GOLAY, A.; YBARRA, J. Link between obesity and type 2 diabetes. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 649–663, 2005.
- 30- GOUVEIA, Neire Moura De; ALBUQUERQUE, Cibele L. De; ESPINDOLA, Laila S.; et al. Pouteria ramiflora extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 1141–1148, 2013.
- 31- GOUVEIA, Neire Moura De; ALVES, Fernanda Vieira; FURTADO, Fabiana Barcelos; et al. An In Vitro and In Vivo Study of the α -Amylase Activity of Phaseolamin. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 8, p. 915–920, 2014.
- 32- GOUVEIA, Sandra; CASTILHO, Paula C. Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD(–)–ESI-MSn method. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 333–344, 2011.
- 33- GU, Liwei; HOUSE, Suzanne E.; WU, Xianli; et al. Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 4057–4061, 2006.

- 34- GUSMAN, J. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 8, p. 1111–1117, 2001.
- 35- HABTEMARIAM, Solomon. α -Glucosidase Inhibitory Activity of Kaempferol-3- *O* -rutinoside. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 2, p. 1934578X1100600, 2011.
- 36- HARBONE JB 1999. Classes and functions of secondary products, In: Walton NJ, Brown DE (Ed.). Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products. London: Imperial College, p.1-25.
- 37- HARBORNE, J. B. Introduction to ecological biochemistry. 4. ed. London: **Academic Press**, 1993.
- 38- HO, Su-Chen; WU, Szu-Pei; LIN, Shyh-Mirn; et al. Comparison of anti-glycation capacities of several herbal infusions with that of green tea. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 768–774, 2010.
- 39- HÜMMER, Wolfgang; SCHREIER, Peter. Analysis of proanthocyanidins. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 12, p. 1381–1398, 2008.
- 40- ISHIKAWA, Akiko; YAMASHITA, Hiromi; HIEMORI, Miki; et al. Characterization of Inhibitors of Postprandial Hyperglycemia from the Leaves of *Nerium indicum*. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 53, n. 2, p. 166–173, 2007.
- 41- JAIN, Preeti. Antibacterial and antioxidant activities of local seeded banana fruits. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 11, p. 1398–1403, 2011.
- 42- JUSTINO, Allisson Benatti. Casca do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) como fonte de compostos antioxidantes com atividade de inibição de α -amilase, α -glicosidase e glicação não enzimática. julho de 2016.
- 43- JUSTINO, Allisson Benatti; MIRANDA, Natália Carnevalli; FRANCO, Rodrigo Rodrigues; et al. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 100, p. 83–92, 2018.
- 44- JUSTINO, Allisson Benatti; PEREIRA, Mariana Nunes; PEIXOTO, Leonardo Gomes; et al. Hepatoprotective Properties of a Polyphenol-Enriched Fraction from *Annona crassiflora* Mart. Fruit Peel against Diabetes-Induced Oxidative and Nitrosative Stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 22, p. 4428–4438, 2017.

- 45- KAWANISHI, Shosuke; HIRAKU, Yusuke; MURATA, Mariko; *et al.* The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 9, p. 822–832, 2002.
- 46- KHAN, Ibrar; AHMAD, Haroon; AHMAD, Bashir. Anti-glycation and anti-oxidation properties of Capsicum frutescens and Curcuma longa fruits: possible role in prevention of diabetic complication. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 1359–1362, 2014.
- 47- KUMAR, Shashank; PANDEY, Abhay K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–16, 2013.
- 48- LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 244–282, 2007.
- 49- LAI, P.; ROY, J. Antimicrobial and Chemopreventive Properties of Herbs and Spices. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1451–1460, 2004.
- 50- LAL SHYAULA, Sajjan; ABBAS, Ghulam; SIDDIQUI, Hina; *et al.* Synthesis and Antiglycation Activity of Kaempferol-3-O-rutinoside (Nicotiflorin). **Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 415–420, 2012.
- 51- LEITÃO FILHO, H. F.; MARTINS, F. R. Espécies de cerrado com potencial em fruticultura. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 2., 1981, Campinas. Anais... Campinas: Unicamp, 1981. p. 1-15.
- 52- LI, H.; NAKAMURA, S.; MIYAZAKI, S.; *et al.* N2-carboxyethyl-2'-deoxyguanosine, a DNA glycation marker, in kidneys and aortas of diabetic and uremic patients. **Kidney International**, v. 69, n. 2, p. 388–392, 2006.
- 53- LI, J. Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 5, n. 2, p. 171–179, 1993.
- 54- LI, Yan Qin; ZHOU, Feng Chao; GAO, Fei; *et al.* Comparative Evaluation of Quercetin, Isoquercetin and Rutin as Inhibitors of α -Glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 24, p. 11463–11468, 2009.

- 55- LIAW, Chih-Chuang; LIOU, Jing-Ru; WU, Tung-Ying; *et al.* Acetogenins from Annonaceae. In: KINGHORN, A. Douglas; FALK, Heinz; GIBBONS, Simon; *et al* (Orgs.). **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 101**. Cham: Springer International Publishing, 2016, v. 101, p. 113–230.
- 56- LINDBERG MADSEN, H. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 8, p. 271–277, 1995.
- 57- LIU, Zai-Qun. Chemical Methods To Evaluate Antioxidant Ability. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 10, p. 5675–5691, 2010.
- 58- MCDOUGALL, Gordon J.; STEWART, Derek. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. **BioFactors**, v. 23, n. 4, p. 189–195, 2005.
- 59- MCLEAN, Jennifer A.; KARADAS, Filiz; SURAI, Peter F.; *et al.* Lipid-soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 141, n. 3, p. 366–372, 2005.
- 60- MCPHERSON, John D.; SHILTON, Brian H.; WALTON, Donald J. Role of fructose in glycation and cross-linking of proteins. **Biochemistry**, v. 27, n. 6, p. 1901–1907, 1988.
- 61- MESÍAS, Marta; NAVARRO, Marta; GÖKMEN, Vural; *et al.* Antiglycative effect of fruit and vegetable seed extracts: inhibition of AGE formation and carbonyl-trapping abilities: Antiglycative effect of fruit and vegetable seed extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 8, p. 2037–2044, 2013.
- 62- MORAIS, Sérgio Antônio Lemos de; AQUINO, Francisco José Tôrres de; NASCIMENTO, Evandro Afonso do; *et al.* Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 198–207, 2008.
- 63- MUTHENNA, Puppala; RAGHU, Ganugula; AKILESHWARI, Chandrasekhar; *et al.* Inhibition of protein glycation by procyanidin-B2 enriched fraction of cinnamon: Delay of diabetic cataract in rats: Antiglycating Potential of Procyanidine-B2. **IUBMB Life**, v. 65, n. 11, p. 941–950, 2013.

- 64- O'BRIEN, Peter J.; SIRAKI, Arno G.; SHANGARI, Nandita. Aldehyde Sources, Metabolism, Molecular Toxicity Mechanisms, and Possible Effects on Human Health. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 7, p. 609–662, 2005.
- 65- OLIVEIRA, Alane Cabral de; VALENTIM, Iara Barros; GOULART, Marília Oliveira Fonseca; *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.
- 66- OLIVEIRA, Andressa Caroline Ferreira de; NOGUEIRA, Jéssica Rodrigues; SILVA, Geverson Façanha da; *et al.* ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Aniba parviflora*. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 4, 2017.
- 67- PANDEY, Kanti Bhooshan; RIZVI, Syed Ibrahim. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270–278, 2009.
- 68- PENG, Xiaofang; ZHENG, Zongping; CHENG, Ka-Wing; *et al.* Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 475–481, 2008.
- 69- PEYROUX, J.; STERNBERG, M. Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. **Pathologie Biologie**, v. 54, n. 7, p. 405–419, 2006.
- 70- PRIOR, Ronald L.; HOANG, Ha; GU, Liwei; *et al.* Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of Plasma and Other Biological and Food Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273–3279, 2003.
- 71- RICE-EVANS, Catherine; MILLER, Nicholas; PAGANGA, George. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152–159, 1997.
- 72- ROESLER, Roberta; CATHARINO, Rodrigo R.; MALTA, Luciana G.; *et al.* Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048–1054, 2007.
- 73- ROHN, Sascha; RAWEL, Harshadrai M.; KROLL, Jürgen. Inhibitory Effects of Plant Phenols on the Activity of Selected Enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3566–3571, 2002.

- 74- SANTANA, D. C.; INOUE, M. H.; VILHENA, K. S. S.; SOUZA FILHO, A. P. S.; POSSAMAI, A.C.S.; PEREIRA, K.M. Potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de *Annona crassiflora*. XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS - Centro de Convenções - Ribeirão Preto – SP, 19 a 23 de julho de 2010.
- 75- SANTOS-BUELGA, Celestino; SCALBERT, Augustin. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1094–1117, 2000.
- 76- SASAKI, Kenroh; CHIBA, Syuko; YOSHIZAKI, Fumihiko. Effect of natural flavonoids, stilbenes and caffeic acid oligomers on protein glycation. **Biomedical Reports**, v. 2, n. 5, p. 628–632, 2014.
- 77- SCHOFIELD, P; MBUGUA, D.M; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1–2, p. 21–40, 2001.
- 78- SHAN, Xindi; LIU, Xin; HAO, Jiejie; *et al.* In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 249–255, 2016.
- 79- SILVA, Mara Reis; LACERDA, Diracy Betânia Cavalcante Lemos; SANTOS, Grazielle Gebrim; *et al.* Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1790–1793, 2008.
- 80- SIMÃO, A.M. Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico. São Paulo: Nobel, 1985.
- 81- SRI HARSHA, P.S.C.; LAVELLI, V.; SCARAFONI, A. Protective ability of phenolics from white grape vinification by-products against structural damage of bovine serum albumin induced by glycation. **Food Chemistry**, v. 156, p. 220–226, 2014.
- 82- SUGIYAMA, Hiroshi; AKAZOME, Yoko; SHOJI, Toshihiko; *et al.* Oligomeric Procyanidins in Apple Polyphenol Are Main Active Components for Inhibition of Pancreatic Lipase and Triglyceride Absorption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 4604–4609, 2007.
- 83- TADERA, Kenjiro; MINAMI, Yuji; TAKAMATSU, Kouta; *et al.* Inhibition of .ALPHA.-Glucosidase and .ALPHA.-Amylase by Flavonoids. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 52, n. 2, p. 149–153, 2006.

- 84- TAPSELL, Linda C.; HEMPHILL, Ian; COBIAC, Lynne; et al. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. **The Medical Journal of Australia**, v. 185, n. 4 Suppl, p. S4-24, 2006.
- 85- TIWARI, P., KUMAR, B., KAUR, M., KAUR, G., KAUR, H. Phytochemical screening and extraction: a review. **Int. Pharm. Sci.** 1 (1), 98–106, 2011.
- 86- TOMA, Alemayehu; MAKONNEN, Eyasu; MEKONNEN, Yelamtsehay; *et al.* Intestinal α -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetala* leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, 2014.
- 87- VIEIRA; R. F.; COSTA; T. S. A.; SILVA; D. B.; FERREIRA; F. R.; SANO; S. M. Frutas nativas da região Centro-oeste do Brasil – Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2010.
- 88- WAGNER, H., BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2a ed. Berlin: **Springer**: 384 p, 1996.
- 89- WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2–3, p. 97–110, 2009.
- 90- WANG, Wei; YAGIZ, Yavuz; BURAN, Timothy J.; *et al.* Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2666–2673, 2011.
- 91- WU, Chi-Hao; HUANG, Shang-Ming; LIN, Jer-An; et al. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. **Food & Function**, v. 2, n. 5, p. 224, 2011.
- 92- WU, Chi-Hao; YEH, Chi-Tai; SHIH, Ping-Hsiao; et al. Dietary phenolic acids attenuate multiple stages of protein glycation and high-glucose-stimulated proinflammatory IL-1 β activation by interfering with chromatin remodeling and transcription in monocytes. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. S2, p. S127–S140, 2010.
- 93- YE, Han-Yang; LI, Zhan-Yuan; ZHENG, Yu; et al. The attenuation of chlorogenic acid on oxidative stress for renal injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 7, p. 989–997, 2016.
- 94- YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **J Agric Food Chem**, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001.

- 95- YOSHIDA, Kaori; HISHIDA, Atsuyuki; IIDA, Osamu; *et al.* Flavonol Caffeoylglycosides as α -Glucosidase Inhibitors from *Spiraea cantoniensis* Flower. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4367–4371, 2008.
- 96- YUAN, Erdong; LIU, Benguo; WEI, Qingyi; *et al.* Structure Activity Relationships of Flavonoids as Potent α -Amylase Inhibitors. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 8, p. 1934578X1400900, 2014.
- 97- ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J. Agric. Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 5165-5170, 2001.
- 98- ZHOU, Hai-Chao; LIN, Yi-Ming; LI, Yuan-Yue; *et al.* Antioxidant properties of polymeric proanthocyanidins from fruit stones and pericarps of *Litchi chinensis* Sonn. **Food Research International**, v. 44, n. 2, p. 613–620, 2011.